

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590672

研究課題名(和文) 組織リモデリングの増悪化分子としての内因性AGEの病態生理と根治的治療への展開

研究課題名(英文) Pathophysiological role of AGEs as exacerbation factor in tissue remodeling and molecular targeted therapy

研究代表者

森 秀治 (MORI, Shuji)

就実大学・薬学部・教授

研究者番号：50220009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：内因性の終末糖化産物(AGEs)の病態生理学的意義を解明し、これを標的とした新規治療法を開発するために、AGEsと相互作用する因子(AGEs結合因子)の探索を行った。AGEsを特異的リガンドに用いた親和性クロマトグラフィ実験によって、肺抽出液中に分子量約70kDaのAGEs結合因子を単離した。本因子は、AGEs-RAGE結合を有意に抑制し、ペプチド解析からN末端領域に独立して2ヶ所の抑制配列が存在していることも明らかとなった。これらの結果は、炎症病巣での内因性AGEsとAGEs結合因子による機能的複合体形成の可能性を示唆するものであり、新たな機能制御に繋がる知見と言える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we isolated AGEs-binding factor of MW 70kDa by affinity chromatography from lung extract to elucidate the pathophysiological significance of AGEs in inflammatory sites, and to develop the novel targeted therapeutics. The binding between AGEs and RAGE was shown to be inhibited by AGEs-binding factor with dose-dependency, particularly by two different peptides in N-terminal region. These findings indicated the formation of functional complex in several inflammatory conditions.

研究分野：薬理学，応用薬理学

キーワード：組織リモデリング 炎症 再生 サイトカイン 分子標的

1. 研究開始当初の背景

(1) 組織リモデリング病態は、超高齢化社会を迎えた我が国において、心筋梗塞・糖尿病・気管支ぜん息などの生活習慣病の主要因と位置付けられ、高い死亡率や重度後遺症による介護などの医療損失も極めて甚大である。その一方で、これら疾患に対する有効な治療法は未だに確立せず、組織リモデリング病態の克服は、21世紀の医療が取り組むべき最重要課題と言える。組織リモデリング病態は、病巣局所での病的な組織構造と機能障害を伴う重篤な難治性疾患であり、これらの発症や増悪化の鍵となる重要因子を同定し、その病態生理学的意義を解明する事は、疾患の未然防止や新たな治療法開発に通じる重要な研究対象と考えられた。

(2) 我々は、重要な免疫細胞である単球 / マクロファージが、細胞接着因子の発現を通じて、リンパ球や内皮細胞などと相互作用し、組織構築や炎症惹起に重要な役割を担っている事を明らかにして来た。その過程で、組織リモデリング病態時（脳梗塞病態など）に病巣局所に新たに出現して来る因子（内因性 AGEs）の存在を見出し、これが病態の増悪化に深く関与している事を発見した。驚くべき事に、本増悪因子（内因性 AGE）は、細胞刺激に伴って細胞内から細胞外へと局在移行し、サイトカイン様活性を示す極めてユニークな因子であった。更に、この内因性 AGEs は白血球遊走や接着因子発現増大などの免疫亢進を招き、その過剰作用は典型的サイトカイン血症を惹起するものであった。加えて、我々は、内因性 AGEs に対する単クローン抗体を開発し、ラット脳梗塞モデル（中大脳動脈の閉塞 - 再灌流モデル）に投与したところ、抗体は梗塞時の過剰生体応答を減弱し、梗塞巣エリアを劇的に縮小させる事を見出した。この脳保護効果は、既知のいかなる臨床治験薬よりも優れ、発症後に投与しても有効性を発揮し得る驚くべきものであった。加えて、抗内因性 AGEs 抗体による治療効果は、クモ膜下出血や糖尿病合併症（アテローム動脈硬化）モデルにおいても観察された。更に、我々は内因性 AGEs の細胞受容体（RAGE）の探索にも着手し、現在、そのクローニングにも成功している。受容体 RAGE はパターン認識受容体の一種であり、内因性 AGEs のみならず、それ以外に糖尿病などの生活習慣病発症に伴って高産生される最終糖化産物（AGEs）に対しても高い結合親和性を示す事が判明している。

(3) これらの知見は、受容体 RAGE を介した過剰シグナルを何らかの手法で遮断する事が組織リモデリング病態の予防や治療に直結する事を示唆するものであり、抗体以外の分子、いわゆる低分子型遮断薬を開発する事が組織リモデリング病態に対する薬物治療を遂行する上で極めて重要であることを裏付けるものであった。

2. 研究の目的

(1) 慢性炎症に起因する組織リモデリングは、脳梗塞や糖尿病などの難治性疾患の増悪化に深く関与し、我が国における死因の上位を占め、重度後遺症に伴う医療負担も甚大であるにも係わらず有効な治療法は未だ確立していない。我々は、組織リモデリング病巣局所に出現し、過剰な免疫亢進作用によって病態の増悪化を招く因子を見出した。加えて、本因子（内因性 AGEs）に対する抗体投与が、疾患動物モデル（糖尿病や脳梗塞モデル等）において著効性を示す事も明らかにし、内因性 AGEs シグナルの遮断が組織リモデリング病態の治療・予防に直結している事を発見した。加えて、内因性 AGEs のみならず AGEs が受容体（RAGE）を刺激して病態増悪化に関与していることも明らかとなって来た。

(2) この様な背景の下、本研究では 1) 内因性 AGEs がコアとなっている炎症性機能分子複合体の同定を手始めに、2) 炎症性機能分子複合体の構成分子間の相互作用に基づく内因性 AGEs の機能制御、更には、3) *in vitro* 結合アッセイ系に基づく内因性 AGEs 遮断薬（分子標的薬）の探索研究を行う事によって、組織リモデリング病態の克服につなげて行く予定である。

3. 研究の方法

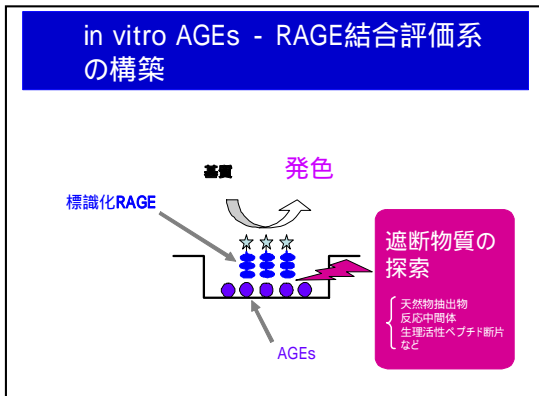
(1) *in vitro* AGEs-RAGE 結合アッセイの確立：はじめにモデルタンパク質（BSA 等）を糖代謝物でカルボニル化反応させ、AGEs 分子を調製する。次に、大腸菌にて発現した組換え体 RAGE を用いて、固相法の原理に基づく AGEs-RAGE 結合アッセイを構築する。この際、RAGE の C 末端に人工的に His タグを導入することによって発色プローブ（Ni-NTA-HRP）結合性を付加し、AGEs-RAGE 結合度を比色法にて評価できる系を構築する。

(2) AGEs をコアとする炎症性機能分子複合体の同定：末端にアミノ基を有する不溶性担体を糖代謝物でカルボニル化反応させ、AGEs 分子を特異リガンドに持った親和性クロマトグラフィ用担体を調製する。これを、動物組織抽出液（例えば、肺組織ホモジネート）と混合し、塩溶液で段階的に洗浄・溶出を行い、AGEs 分子に高親和性を示す生体因子画分を回収する。これを SDS-PAGE で分離し、銀染色後の泳動バンドを切り出し、質量分析にかけることで AGEs 結合因子の同定をはかる。

(3) AGEs 結合因子の病態生理学的意義の解明：同定した AGEs 結合因子を遺伝子組換え体として調製し、AGEs-RAGE 結合評価系に供し、結合抑制が認められた場合には、オーバーラップペプチドを用いて、結合抑制活性の最小配列を検討し、低分子化を図っていく。

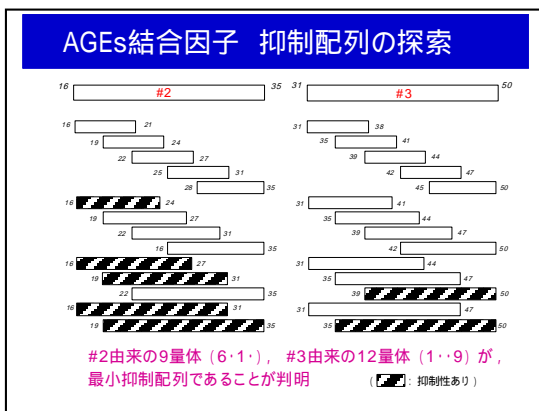
4. 研究成果

(1) 96 ウェルマイクロプレート中で、調製した AGEs に対して、組換え体 RAGE (His タグ付加)、発色プローブ (Ni-NTA-HRP)、基質 (ABTS + H₂O₂) を順に反応させ、固相法の原理に基づく結合評価系の確立を試みたところ、AGEs および RAGE の濃度依存的に発色増加が認められ、簡便な結合評価系を構築することに成功した。



(2) AGEs を特異リガンドにした親和性担体を調製し、これを肺臓抽出液と混合した後、種々の塩濃度 (0.15 ~ 0.5 mol/L NaCl) を持ったリン酸緩衝液を用いて、段階的に洗浄ならびに溶出画分の回収を行った。0.5 mol/L NaCl 溶出画分を SDS-PAGE にて分離し、銀染色、ゲル切り出し、質量分析を行ったところ、AGEs 結合因子を単離することに成功した。

(3) AGEs 結合因子の組換え体を調製し、前述の AGEs-RAGE 結合評価系にかけたところ、濃度依存的に結合を抑制することが明らかとなり、1 μmol/L で約 50% の結合抑制性を示すことが明らかとなった。結合抑制活性の最小配列を明らかにするために、一次配列に基づいてオーバーラッピングペプチドを合成し、結合評価系にかけたところ、AGEs 結合因子の N 末端領域付近に独立して 2 ヶ所の結合抑制活性を示すペプチド領域が存在することが明らかとなった。



これらの知見は、AGEs が病巣局所では単独ではなく何らかの機能的複合体を形成して存在

していることを示唆しており、この複合体形成に人為的に干渉することによって、新たな薬物治療法 (病態制御法) の可能性の道を開き開くことが出来るものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

森 秀治, 高橋英夫, 豊村隆男: 生活習慣病の増悪化因子「HMGB1, AGEs - RAGE 系」に対する創薬プラットフォーム構築. 日本薬理学雑誌, 査読有, 143 巻, 2014, 14-17

Okuma Y, Liu K, Wake H, Liu R, Nishimura Y, Hui Z, Teshigawara K, Haruma J, Yamamoto Y, Yamamoto H, Date I, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M: Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1- RAGE interaction. Neuropharmacology, 査読有, 85 巻, 2014, 18-26
DOI:10.1016/j.neuropharm.2014.05.007

Takahashi HK, Sadamori H, Teshigawara K, Niwa A, Liu K, Wake H, Mori S, Yoshino T, Nishibori M: Histamine inhibits high mobility group box 1-induced adhesion molecule expression on human monocytes. Eur J Pharmacol, 査読有, 718 巻, 2013, 305-313
DOI:10.1016/j.ejphar.2013.08.017

Takahashi HK, Sadamori H, Liu K, Wake H, Mori S, Yoshino T, Yamamoto Y, Yamamoto H, Nishibori M: Role of cell-cell interactions in high mobility group box 1 cytokine activity in human peripheral blood mononuclear cells and mouse splenocytes. Eur J Pharmacol, 査読有, 701 巻, 2013, 194-202
DOI:10.1016/j.ejphar.2012.11.058

Okuma Y, Liu K, Wake H, Zhang J, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Otani N, Tomura S, Shima K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M: Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. Annal Neurol, 査読有, 72 巻, 2012, 373-384
DOI:10.1002/ana.23602

〔学会発表〕(計 10 件)

豊村隆男, 和氣秀徳, 勅使川原匡, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋, 森 秀治: 非炎症性物質 SHIL001 及び SHIL002 による破骨細胞分化促進作用. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日, パシフィコ横浜 (横浜)

森 秀治, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 西堀正洋, 豊村隆男: HMGB1 結合因子の網羅的アレイ探索と機能調節. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日, パシフィコ横浜 (横浜)

森 秀治, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 西堀正洋, 豊村隆男: HMGB1 結合因子による AGEs-RAGE 結合阻害解析. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 16 日, 国立京都国際会館 (京都)

横山隆太, 豊村隆男, 和氣秀徳, 勅使川原匡, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋, 森 秀治: AGEs 結合親和性に基づいた AGEs 遮断ペプチドの同定. 第 125 回日本薬理学会近畿部会, 2014 年 6 月 20 日, 岡山コンベンションセンター (岡山)

森 秀治, 豊村隆男, 和氣秀徳, 勅使川原匡, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋: 70kD AGEs 結合因子による AGEs-RAGE 結合抑制作用. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 5 日, 神戸国際会議場 (神戸)

森 秀治, 豊村隆男, 和氣秀徳, 勅使川原匡, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋: AGEs-RAGE 相互作用に基づいた遮断物質探索系への応用. 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11 日, パシフィコ横浜 (横浜)

森岡祐太, 周京秀, 渋谷恵, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 森 秀治, 西堀正洋: マクロファージによる advanced glycation endproducts の細胞内取り込み. 第 123 回日本薬理学会近畿部会, 2013 年 7 月 12 日, 名古屋国際会議場 (名古屋)

森 秀治, 豊村隆男, 高橋英夫: 生活習慣病の増悪化因子「HMGB1, AGEs-RAGE 系」に対する創薬プラットフォーム構築. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 3 月 23 日, 福岡国際会議場 (福岡)

豊村隆男, 和氣秀徳, 劉克約, 高橋英夫, 五味田裕, 西堀正洋, 森 秀治: 非炎症性物質の長期曝露に伴うマクロファージの炎症応答変化. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日, 福岡国際会議場 (福岡)

茅野高志, 豊村隆男, 小野秀和, 早野雅貴, 飛田直樹, 和氣秀徳, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋, 五味田裕, 森 秀治: 終末糖化産物 (AGEs) -AGEs 受容体結合に基づく創薬プラットフォームの構築. 第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会,

2012 年 11 月 11 日, 島根県民会館 (松江)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 秀治 (MORI Shuji)
就実大学・薬学部・教授
研究者番号: 50220009

(2) 研究分担者

五味田 裕 (GOMITA Yutaka)
就実大学・薬学部・元教授
研究者番号: 00088709
(平成 24 年度のみ研究分担者)

豊村 隆男 (TOYOMURA Takao)
就実大学・薬学部・助教
研究者番号: 40425137
(平成 25 年度より研究分担者)